

1. 遺伝子発現解析とデータ解析

星田有人, 油谷浩幸

マイクロアレイによるトランスクリプトームデータ解析はすでに日常的に行われるようになり、さまざまな生物学的な研究課題に特化した問題点や課題が徐々に明らかになっている。それに伴い新たな解析手法の開発や、プローブ設計を含むプラットフォーム自体の改良が急速に行われており、当初の目標の1つであった臨床応用も全く非現実的なものではなくなりつつある。また、トランスクリプトームデータは網羅性が高く、次々と生成される多様なゲノミクスデータを統合する際の核の1つとしてもさらに重要になっている。

はじめに

現在、mRNA、miRNA、タンパク質、遺伝子多型、転写因子結合部位、染色体の構造変化などの多様なゲノミクスデータを測定するテクノロジーが次々と登場している。これらの嚆矢となったDNAマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析は、再現性、コスト、コンテンツであるプローブのデザインや遺伝子のアノテーションなどの点で十分日常的に使用できるレベルに達しつつある。またそのデータ解析は新たな研究領域を創出し解析に関するコンセンサスも形成されつつある^{1)~3)}。本稿ではそのプラットフォーム、データ解析の手法などに関する最近の動向を概説する。

【キーワード&略語】

機能ゲノミクス, トランスクリプトーム, マイクロアレイ

FDR: false discovery rate

FWER: family-wise error rate

GIM: genome imbalance map

■ トランスクリプトームデータ解析

トランスクリプトーム解析の普及の理由として、RNA塩基の生化学的な多様性がタンパク質のように大きくない、増幅が容易、RNA安定化技術の向上、豊富なアノテーションなどのみならず、分子生物学のプロセスのプロファイリングや興味のある表現型に関連する遺伝子(群)のスクリーニングにある程度成功を収めてきたことがあげられるだろう。mRNAの発現量は、生物学のプロセスにおいて中心的な役割をもつタンパク質の発現量とは必ずしも相関しておらず、翻訳後修飾やリン酸化による制御など転写産物レベルで直接確認できない過程が多数存在する。しかしながら、主要な生物学のプロセスの状態の変化は、直接にせよ間接にせよ転写産物のプロファイル(シグネチャー)に生じる影響として捉えることが可能であると考えられる。

また、「同様な発現パターンを示す遺伝子群は機能的な関連を有している」という仮定がある程度有効であることもあげられる(「遺伝子クラスタリングドグマ」ともよばれている¹⁾)。実際に、リボソームタン

Transcriptome data analysis

Yujin Hoshida/Hiroyuki Aburatani: Genome Science Division, Research Center for Advanced Science and Technology, University of Tokyo (東京大学先端科学技術研究センターゲノムサイエンス部門)

表 大規模トランスクリプトーム解析の主要なプラットフォーム

| プラットフォーム | プローブ (/転写産物) | 転写産物数 | ラベル | URL |
|------------------|-----------------------|----------|-----|--|
| 1) スポット型cDNAアレイ | Stanford型アレイ | 任意 | 任意 | 2色 http://cmgm.stanford.edu/pbrown/ |
| 2) オンチップ合成オリゴアレイ | Affymetrix社 | 25mer×11 | 47K | 単色 http://www.affymetrix.com |
| | NimbleGen社 | 60mer×5 | 38K | 単色 http://www.nimblegen.com |
| | Agilent Technologies社 | 60mer | 41K | 2色 http://jp.home.agilent.com |
| 3) スポット型オリゴアレイ | Amersham Biosciences社 | 30mer | 57K | 単色 http://www.jp.amershambiosciences.com |
| 4) ビーズアレイ | Illumina社 | 50mer×2 | 48K | 単色 http://www.illumina.com |
| | Lynx社 | 17~20mer | * | ** http://www.lynxgen.com |

* ビーズ上にクローニングした任意のcDNAライブラリの配列決定を同時に行う(Massively Parallel Signature Sequencing [MPSS])
 ** SAGEのようにクローンのカウント数を遺伝子発現の絶対量とする。競合ハイブリにより発現の異なる遺伝子も検討可能

バク質や転写開始複合体などのタイトな生物学的プロセスに参与する遺伝子群はどのような測定プラットフォームや解析手法においてもほぼ同様の強固なクラスターを形成する。

一方、プラットフォーム依存的な実験手技上のアーチファクトや生物学的なばらつきによるノイズが相当量存在することも事実である。機能ゲノミクス研究におけるデータ解析には、現時点において特性が完全には明らかになっていないこれらのノイズの中から生物学的、臨床的に意味のある知見を抽出するフィルターの役割が期待されている。

2) 遺伝子発現解析のプラットフォーム

遺伝子発現測定のためのDNAマイクロアレイは、スライドガラスやビーズなどの支持体上に固定したDNAプローブとのハイブリダイゼーションにより、数千~万に及ぶRNA種を同時に定量する技術である。主要なアレイプラットフォームの概要を表に示す。これらのアレイの多くについてはカスタムアレイ作製サービスも行われている。

アレイ実験の結果は、プラットフォーム間、同一プラットフォームの世代間、実験者や実験施設間の差に影響されることが知られており、とりわけアレイ間の誤差を解消するためには工業化を含めた品質管理の重要性が指摘されている⁴⁾。

3) データ解析

アレイデータは、従来の分子生物学データとも臨床疫学データとも異なる特性をもつため、その解析手法の開発自体が新たな研究分野となっており、情報科

学、統計学などの幅広い領域の研究者が参入している。これらは既存の解析手法の単なる適用のみならず、データに対してどのような仮定が適切かを明らかにすることによりトランスクリプトームの生物学的な挙動の解明に寄与する研究であるとも言えるだろう。AlizadehやGolubらのアレイデータは、統計学におけるFisherのアイリスデータのように新たな解析手法のベンチマーキングに使われている¹⁾。

1) データの前処理、実験デザイン

アレイデータの正規化はプローブのハイブリダイゼーションなどに関する実験データや仮定に基づいており、解析結果に大きな影響を及ぼすことから、アレイ実験のデザインとともに多くの研究がなされている¹⁾。また遺伝子のフィルタリングを含む前処理の手法の選択は、マーカー探索やクラス発見などの解析の目的により異なる。またゲノミクスデータに特有の問題として、遺伝子アノテーションの頻繁な更新に対するアップデートも重要である⁵⁾。

2) データマイニング^{*)}

大きな分類として、データセットに内在する構造を探索するi)~iii)を教師なし(unsupervised)法、興味のある外部情報に関連するデータを抽出するiv)~vi)を教師付き(supervised)法とする場合が多い。

i) 次元削減

アレイデータはきわめて高次元であるため、解釈が容易になるように次元削減がしばしば行われる。デー

*) データマイニング

データセットに含まれる要素間の関係や内在するパターンなどを探索すること。

タセット内の変動の大きい成分のみを抽出する主成分分析 (PCA : principle component analysis) や要素間の距離に基づく多次元尺度 (MDS : multidimensional scaling) などはデータの視覚化に用いられる。特異値分解 (SVD : singular value decomposition) や非負値行列分解 (NMF : non-negative matrix factorization) などの行列分解による次元削減は多数の遺伝子を少数の「メタジーン*2」にまとめることによる識別や機能クラスタリングに使われている^{1) 6) 7)}。

ii) クラスタリング

標準的に用いられている階層クラスタリングの欠点を克服すべくさまざまな研究がなされている。ノイズの中から意味のある小クラスターを抽出する Super-Paramagnetic Clustering⁸⁾ や、乱数に基づく多数の初期条件を用いてクラスターの再現性を評価する Consensus Clustering⁹⁾ などは有用である。

iii) 遺伝子ネットワークの推定

ベイジアンネットワーク*3を応用した酵母における遺伝子間の機能ネットワーク推定が報告されている²⁰⁾。遺伝子発現データ間の相関係数に基づく共発現ネットワーク (coexpression networks) による遺伝子の機能クラスタリングが試みられている¹⁰⁾。また非線形の関連を捉えるために相互情報量を用いたパッケージも公開されている²¹⁾。

iv) 表現型の代用

遺伝子発現プロファイルを細胞の分化を示す表現型の代わりに用いることにより、薬剤のスクリーニングが行われている¹¹⁾。

v) 特異的に発現する遺伝子

アレイ解析の主要な応用の1つであり、倍率変化のほか、平均と標準偏差で標準化した後に任意の割合の遺伝子を用いる手法 (Zスコア)、群間比較の仮説検定、ある測定データが与えられたときに発現が変化していると考えられる確率を計算するベイズ法、統計モ

デルなどが一般的に用いられている¹⁾。

vi) 臨床マーカーの構築

表現型などの外部情報をガイドとして新たなサンプルの分類や識別を行う。パターン識別や臨床診断学の手法がほぼそのまま適用されている領域であり、**4**に述べるパイプライン化のよい対象であろう。分子マーカーの構築は魅力的なテーマであるが、ゲノミクス研究に特異的な問題点に留意する必要がある¹²⁾。

vii) Semi-supervised 法

完全に理想的な表現型情報が揃ったデータを得ることが難しい生物医学研究において、限られた情報から統計学的に有意かつ生物医学的に意味のある知見を最大限に引き出すため、前述の i) ~ vi) の教師なし、教師付き法の組み合わせが試みられている¹³⁾。例えば教師なし法で発見したクラスを教師として識別器を構築するなどである。

3) 有意性の評価

データ解析の結果を「有意」と判定する閾値を決定するための重要なステップであり、活発な研究がなされている¹⁾。注意しなければならないのは、たとえ有意と判定されたとしてもそのデータセットのみに過剰適合した一般化できない結果である場合が大部分であり、**4**) に述べる検証の過程が必須になるということである¹²⁾。

i) 並べ替え検定

データマイニングの過程で用いる統計量やスコアの分布が既知の確率分布 (ガウス分布、二項分布など) に従う保証はどこにもない。並べ替え検定はこのような状況に対処するきわめて現実的な手法である。もとのデータセットに含まれるデータをランダムに並べ替えて計算された統計量の分布を帰無分布とし、もとの統計量より有意な並べ替えの数の割合を p 値 (nominal p-value) として用いる。どの並べ替えデータのセットを用いるかは、データセットに対する仮定に依存する (遺伝子間の相互作用の有無に対する仮定など)^{1) 2)}。

ii) 多重性の補正

数千~万という遺伝子の数だけ仮説検定を繰り返す場合、多重性を補正する必要が生じる。1つのデータセット全体のどこかでタイプ I エラー (偽陽性) が起きる確率 (FWER : family-wise error rate) をコントロールする Bonferroni 補正は保守的で多くの偽陰性の原因となるため、FDR (false discovery rate) な

※2 メタジーン

複数の同様なパターンを示す遺伝子をまとめた少数の仮想的な遺伝子。「メタジーン」をクラスタリングなどに用いている報告が散見される⁶⁾。

※3 ベイジアンネットワーク

事前確率と事後確率を尤度により結びつけるベイズの定理に基づき遺伝子間の相互作用の確率的なネットワークを構築する手法。

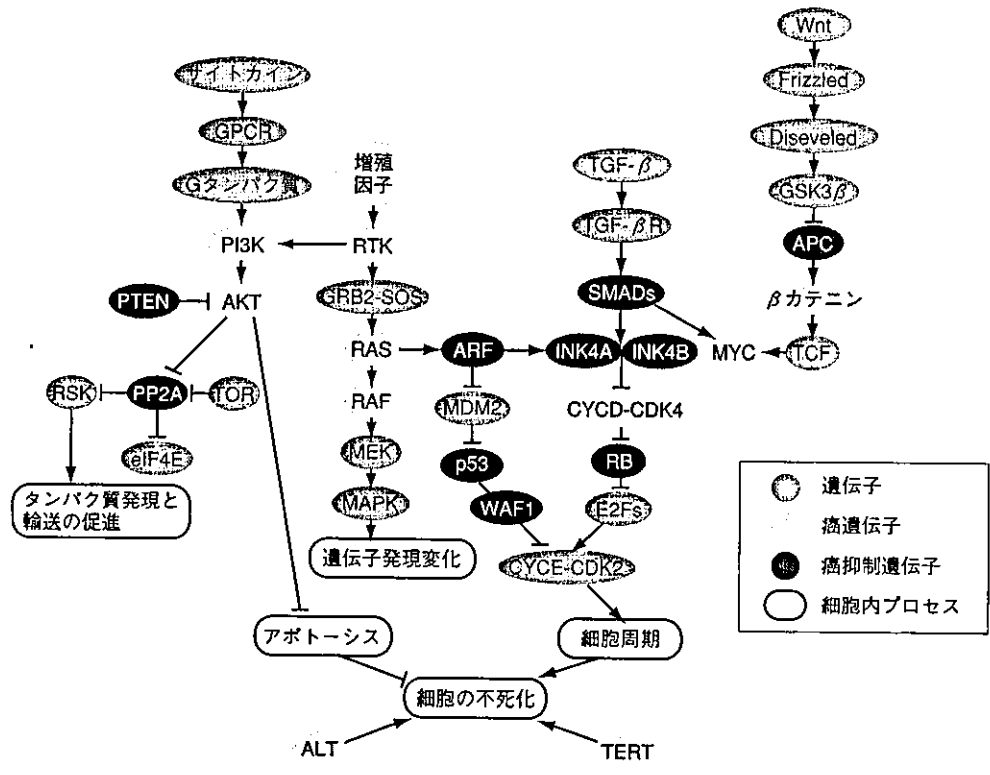


図1 文献情報から抽出した遺伝子間の相互作用ネットワーク
PubMedおよび主要生物医学雑誌の論文からテキストマイニングにより抽出した遺伝子群を用いて再構築した遺伝子間のネットワーク。Wnt/ β カテニン, Smadシグナル伝達経路, MAPKカスケードなどの相互作用を示す

どのステップワイズな補正が頻用される^{1) 2)}。

4) 解析結果の検証, 生物学的な意味づけ

i) 計算機上の検証

a. 交差検証 (cross validation)

分類や識別の評価には, 新たなデータによる検証や, サンプル数が限られている場合には元データを用いた交差検証やブートストラップ法⁴⁾などが標準的に用いられる^{1) 2)}。独立したデータセットを用いた検証が行われているマイクロアレイ研究はわずか10%しかないと言われている。また十分なサイズの検証セットを用いていない研究も多くみられる。これらの検証は解

析結果が一般化できるか否かに直接かかわっている¹²⁾。

b. バスウェイへのマップ

解析の結果得られるのは通常, 何らかの統計量やスコアの順にソートされたプローブIDのリストである。これらから生物学的な意味を汲み取るための試みの1つとして既知の生物学的機能に属する遺伝子セット(ここではバスウェイとよぶ)が用いられている¹⁴⁾。

選び出した遺伝子の発現レベルを単純にバスウェイ上にマップし視覚的なチェックを行う方法から, 選び出した遺伝子リスト中に有意に多く含まれるバスウェイの探索, ソートされた遺伝子リストにおいて有意な偏りを示すバスウェイの探索を行う手法などが用いられている^{15) 16)}。またわれわれの研究室においては遺伝子リストを文献情報に基づくタンパク質間の相互作用ネットワークにマップするシステムを構築している(図1)。

※4 ブートストラップ法
標本数が限られているため用いる統計量の分布が不明な場合に, オリジナル標本から回復を許しサンプリングしたランダム標本における統計量を得ることにより推定する手法(通常数千回のサンプリングを行う)。推定した分布をもとにp値や統計量の信頼区間が計算できる。

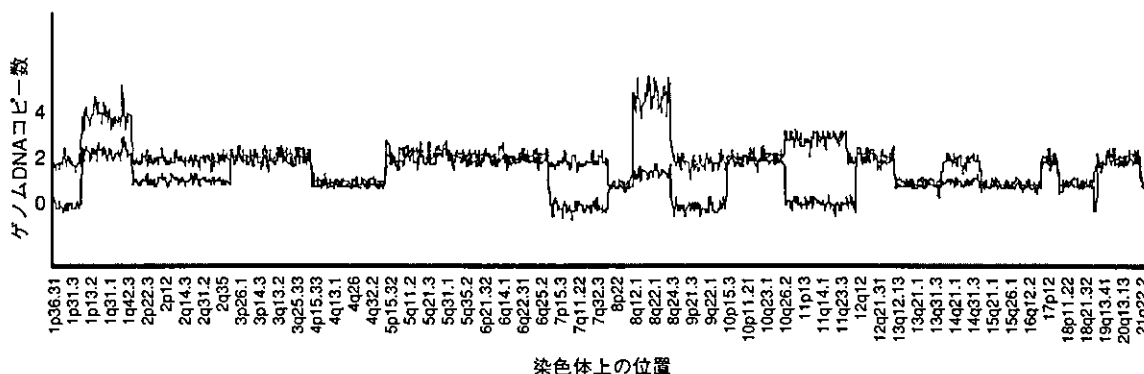


図2 SNPアレイによる genome imbalance map (巻頭写真1参照)

Affymetrix社のGeneChip®, Mapping arrayのシグナルデータに対して独自の正規化を行い描出したゲノムのコピー数変化。Mapping arrayはもともと、一塩基多型(SNP)のタイピングのために設計されたアレイであるため、従来のCGH解析と異なり、多型の情報を利用してアレル別のコピー数変化を描出できる。また1~10万座位の高密度データから高解像度のゲノムの構造情報を得ることができる。グレーはコピー数が多いアレル、黒はコピー数が少ないアレルを表す

ii) 生物学的な検証

標準的に行われている定量PCRのほかにも、組織上で発現遺伝子を定量的に評価する手法が使われはじめている¹⁷⁾。

5) メタ解析

アレイデータの集積に伴い¹⁸⁾、プラットフォーム間の再現性やサンプルサイズの問題を克服すべくメタ解析が報告されはじめている¹⁹⁾。群間比較²⁰⁾、共発現ネットワークのメタ解析^{11) 21)}が報告されている。

6) 他のゲノミクスデータとの統合

ORFomeやpromoteromeやreactomeなど留まるところを知らず多様化するゲノミクスデータは、トランスクリプトームデータがカバーできない領域を補完するものと期待される。われわれの研究室ではSNPアレイのデータからゲノムのアレル別のコピー数変化を描出するGIM (genome imbalance map)を開発している(図2)。このようなゲノム構造の変化は遺伝子の発現レベルにも影響を及ぼしており、発現データと組み合わせることにより効率的に疾患関連遺伝子の発現変化を捉えることが可能になると思われる。

アレイデータ解析には、既存の統計学的なツールを巧みに組み合わせて「尤もらしい有意性」をつくり出そうとするトリッキーな側面があるのは否めない。劣決定性を有するデータセットからの過剰な解釈は容易に起こりうる(数千~万もの遺伝子に対して、わずか

数十~百のサンプルしかなければ答えはいくらでも存在しうるかもしれない)。以上に紹介したような手法が前提としている仮定のどれが妥当であるかを判断するには、トランスクリプトームの挙動の詳細がより明らかになる必要があるだろう²²⁾。

4. データ解析のパイプライン

以上のようにアレイデータ解析は多くのステップを経るが、最近の論文では詳細が記述されないこともままある。よく使われているBioConductor²³⁾のlimmaやaffyなどのパッケージなどを使ったとしても数値変換などの解析フローの詳細が不明であれば解析結果が再現できない場合もある。このような状況を避けるため、大量のデータ解析を日常的に行っている研究室では解析フローの自動化を行っているであろう。

最近ではそのようなデータ解析パイプラインや解析環境の構築をサポートするフリーのパッケージが登場している。GenePatternではPerl, Java, R, Matlabといった任意のコードのモジュールを組合わせて作製したパイプラインファイルをやり取りすることにより解析が完全に再現できる²⁴⁾(図3)。クラス識別と交差検証などの定番の解析はすでに実装されている。またサーバー/クライアント型のソフトなので、数日を要するような重い計算は別のサーバーに投げておくこともできる。米国NCIのcaArrayは統合データ解析環

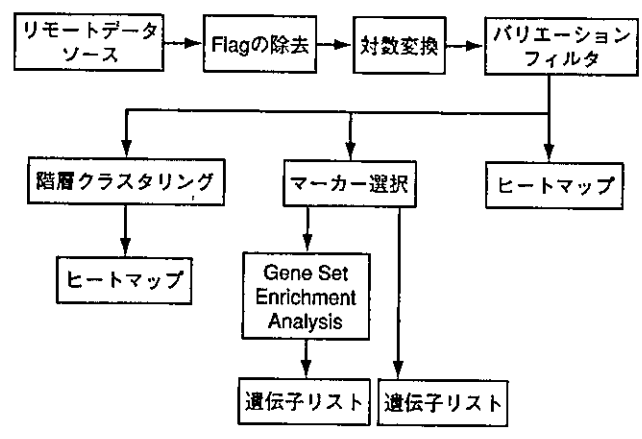


図3 GenePattern におけるデータ解析パイプラインの例
 データ解析ソフトウェアGenePatternでは、データの前処理、複数の並行する解析とその結果のリスト作成や視覚化の手順をパイプラインファイルとして構築、保存することができる。このファイルを実行することにより、全く同じデータ解析が容易に再現できる

境の構築をサポートするオープンソースプロジェクトである²⁵⁾。

おわりに

機能ゲノミクスが生物医学研究に貢献するためには、質の高い表現型データの取得が重要な問題になる。また今後、技術開発とコストダウンによりゲノミクスデータの入手はより安価で容易になり、十分な検出力が得られる症例数でデータ測定ができるようになるであろうことを考えると、サンプルサイズ計算法の整備も望まれる¹⁾。以上に述べたような情報解析のためのスタッフおよびインフラの整備はゲノミクス研究においてクリティカルな問題になると思われる。

文献

- 1) 『統合ゲノミクスのためのマイクロアレイデータアナリシス』(Kohane, I. S. 他/著, 星田有人/訳), シュプリンガーフェアラーク東京, 東京, 2004
- 2) Geoffrey, J. et al.: Analyzing microarray gene expression data, Wiley, UK, 2004
- 3) Genes in action : <http://www.sciencemag.org/sciext/genome2004/>
- 4) Tumor Analysis Best Practices Working Group : Nature Rev. Genet., 5 : 229-237, 2004
- 5) Onto-Translate : <http://vortex.cs.wayne.edu/projects.htm#Onto-Translate>
 GeneCruiser : <http://www.broad.mit.edu/cancer/genecruiser/src/main.jsp>
- 6) Brunet, J. P. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101 : 4164-4169, 2004
- 7) Kim, P. M. & Tidor, B. : Genome Research, 13 : 1706-1718, 2003
- 8) Getz, G. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97 : 12079-12084, 2000
- 9) Monti, S. et al. : Machine Learning Journal, 52 : 91-118, 2003
- 10) Segal, E. et al. : Nature Genet., 36 : 1090-1098, 2004
- 11) Stegmaier, K. et al. : Nature Genet., 36 : 257-263, 2004
- 12) Ransohoff, D. F. : Nature Review Cancer, 4 : 309-314, 2004
- 13) Bair, E. & Tibshirani, R. : PLoS Biol., 2 : E108, 2004
- 14) GENE ONTOLOGY CONSORTIUM : <http://www.geneontology.org/index.shtml>
 BioCarta : <http://www.biocarta.com/>
 GenMapp : <http://www.genmapp.org/>
- 15) Onto-Express : <http://vortex.cs.wayne.edu/Projects.html#Onto-Express>
 DAVID : <http://apps1.niaid.nih.gov/david/>
- 16) Mootha, M. K. et al. : Nature Genet., 34 : 267-273, 2003
- 17) Luminex : <http://www.luminexcorp.com/>
 QuantumDot : <http://www.qdots.com/live/index.asp>
- 18) Gene Expression Omnibus : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>
 ArrayExpress : <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>
- 19) Moreau, Y. et al. : Trends Genet., 19 : 570-577, 2004
- 20) Rhodes, D. R. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101 : 9309-9314, 2004

- 21) Lee, H. K. et al. : Genome Research, 14 : 1085-1094, 2003
- 22) Ueda, H. R. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101 : 3765-3769, 2004
- 23) Bioconductor : <http://www.bioconductor.org/>
- 24) GenePattern : <http://www.broad.mit.edu/cancer/software/genepattern/index.html>
- 25) caArray : <http://caarray.nci.nih.gov/caARRAY>
- 26) Lee, I. et al. : Science, 306 : 1555-1558, 2004
- 27) ARACNE : <http://amdecbioinfo.cu-genome.org/html/caWorkBench.htm>

<筆頭著者プロフィール>

星田有人：筑波大学医学専門学群卒業，2004年より Cancer Genomics, Broad Institute, MIT and Harvard University (旧 Whitehead Institute, Center for Genome Research), Golub 研究室に留学中。生物学的に新たな知見を抽出する解析アルゴリズムとテクノロジーを臨床情報と統合したトランスレーショナルな機能ゲノミクス研究をめざしています。

E-mail : hoshida@broad.mit.edu

厚生労働科学研究研究費補助金
萌芽的先端医療技術推進研究事業

薬物トランスポーターの分子多様性と機能解析
および副作用発現との連鎖解析に関する研究

平成14～16年度 総合研究報告書(1/2)

主任研究者 杉山 雄一

平成17(2005)年3月

目 次

| | |
|---|----|
| I. 総合研究報告 | |
| 薬物トランスポーターの分子多様性と機能解析および副作用発現との連鎖解析 杉山雄一 | 1 |
| II. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 17 |
| III. 研究成果の刊行物・別刷 | 26 |

厚生科学研究費補助金（萌芽の先端医療技術推進研究事業）

総合研究報告書

薬物トランスポーターの分子多様性と機能解析および副作用発現との連鎖解析

主任研究者 杉山 雄一 東京大学・大学院薬学系研究科 教授

研究要旨 本研究では、トランスポーターの薬物動態における寄与の評価、遺伝的多型による機能変動、薬物間相互作用に関する検討を行った。まず、薬物間相互作用としては、cerivastatin と cyclosporin A の相互作用が、OATP1B1 を介したものであることを定量的に明らかにした。また、cerivastatin と gemfibrozil の相互作用は、gemfibrozil glucuronide による OATP1B1・CYP2C8 のトランスポーター・代謝の両方の阻害に起因することを明らかにした。次に毒性関連では、biguanide 系化合物の乳酸アシドーシス発現には、肝臓における OCT1 の発現が重要であることをノックアウト動物を用いた解析から明らかにした。statins の睡眠障害など中枢毒性とトランスポーターの係わり合いについて検討するため、脳からの efflux 機構について解析し、同種薬でも排泄経路が異なる可能性をしめした。また、肝取り込み・排泄に関与するトランスポーターの寄与を明らかにする方法論を構築した。また、遺伝子多型に関する検討では、OATP1B1, BCRP の多型について *in vitro* 解析を行い、OATP1B1*15, BCRP Q141K がそれぞれ、固有の輸送能力の低下および発現量の低下による機能低下を示すことを明らかにした。臨床では、(1) OATP-C, OAT3 遺伝子変異とプラバスタチン体内動態およびコレステロール低下作用、(2) OATP-C, MRP2 遺伝子変異と肝ビリルビン輸送の個人差、(3) BCRP 遺伝子変異と 4-メチルウンベリフェロン(基質医薬品)の体内動態およびヒト臓器でのタンパク発現量への関与、(4) OCT1 遺伝子変異とメトホルミンによる血糖降下作用、(5) MDR1 遺伝子プロモーター変異とヒト臓器でのタンパク発現量への関与について明らかにした。難治性疾患に対する新治療法開発のため、臨床的検討として悪性腫瘍に対する樹状細胞療法の効果とその免疫動態解析を行い、基礎的検討としては胎盤由来間葉系細胞の動物モデルにおける虚血性疾患や皮膚創傷に対する効果を検討した。臨床的検討として第IV期悪性黒色患者 10 例を対象に、腫瘍溶解液を用いた樹状細胞療法第 I 相研究を行なった。基礎的検討として満期産のヒト胎盤から得られた間葉系細胞(hPDMC)を培養して検討した。また、発現多様性の検討として、末梢血中や EBV リンパ球のトランスポーターの発現量をマイクロアレイで定量し、発現量の個人差を見る一方、SNPs を利用した発現量多様性の質量分析を用いた評価系を構築し、2 アレル間で発現量の多様性があることを示した。

分担研究者

家入 一郎（鳥取大学・医学部附属病院薬剤部、助教授）

山下 直秀（東京大学・医科学研究所附属病院、教授）

油谷 浩幸（東京大学・国際・産学共同研究センター、教授）

A.研究目的

医薬品の副作用の発現には大きな個人差が存在し、その規定因子として体内動態の個人差があげられる。これまで、代謝酵素に焦点を当てた研究が進められていたが、近年、非常に多くの薬物トランスポーター群が同定、機能解析されるに従い、その薬物動態に与える影響の重要性が明らかにされつつある。従って、医薬品の安全性を確保するにあたり、トランスポーターを考慮することが必須であると考えた。本申

請研究では、*in vitro* ヒトトランスポーター遺伝子発現系・ヒト凍結肝細胞を用いた研究ならびに、遺伝子欠損動物を用いた研究を通して、各トランスポーターの薬物動態における寄与の評価、遺伝的多型による機能変動、薬物間相互作用に関する検討を通じて、医薬品開発および適正使用における安全性確保をはかるための薬物動態・副作用予測システム構築の基盤作りをすすめることを目的とした。さらには、それらの成果を実証するために、各種臨床研究を織り交ぜながら検証を行い、また、発現量の多様性を評価しうるようなマイクロアレイシステムの開発などを通じて、総合的に薬の副作用、効果とトランスポーターの関連について評価を行った。

B.研究方法

1) 副作用発現の原因となるトランスポータ

一の *in vitro* 実験系による同定および *in vivo* 臨床データ解析

1. cerivastatin(CER)と cyclosporin A(CsA)ならびに gemfibrozil(GEM)との相互作用メカニズムの解析として、トランスポーター発現細胞、共発現系を用いた *in vitro* 輸送実験ならびに、相互作用薬による CER 輸送の阻害を観察した。さらに、代謝阻害の影響も調べるため、ヒト肝臓ミクロソームを用いた代謝阻害実験も試みた。

2. biguanide 系化合物の乳酸アシドーシス発現における有機カチオントランスポーター Oct1 の関与を調べるため、biguanide 系化合物 3 種の輸送を Oct1 発現細胞を用いて検討し、さらに Oct1(-/-)マウスを用いて血中濃度推移や臓器分布の差、血中乳酸値の変動を野生型マウスと比較した。ラット遊離肝細胞を用いて biguanide 化合物によるミトコンドリア酸素消費量を測定した。

3. HMG-CoA 還元酵素阻害薬(statin)の副作用である睡眠障害を理解するため、statin の脳内移行に関与するトランスポーターの同定研究として、Oat3, Oatp2 発現細胞を用いた取り込みならびに、brain efflux index(BEI)法による脳からの statin の排出を測定した。

4. OATP1B1 と BCRP の遺伝子多型変異体を作成し、*in vitro* 実験系において、局在・発現・機能に関する解析を野生型と比較して行った。OATP1B1 については、野生型(OATP1B1*1a)、N130D(OATP1B1*1b)、V174A(OATP1B1*5)、ならびに N130D & V174A(OATP1B1*15)の 4 種類に関して、BCRP については、これまでに知られているヒト BCRP の遺伝子多型 7 種 (V12M, Q141K, A149P, R163K, Q166E, P269S, S441N) について解析を試みた。

5. ヒト肝臓に発現する取り込みトランスポーター、排泄トランスポーターの個々の寄与率を評価するため、取り込みトランスポーターについては、OATP1B1, OATP1B3 安定発現 HEK293 細胞を構築し、各種放射標識化合物の取り込みを観察した。また、ヒト凍結肝細胞を用いて、遊離細胞の状態では基質の取り込みを観察した。発現量は、抗 OATP1B1, OATP1B3 抗体を作成し、細胞から crude membrane を調製し Western blot 法でバンド濃度を相対的に比較することで見積もった。また、排泄側については、共発現系の構築に関しては、OATP1B1/MRP2 発現系に関しては、当教室で既に構築されているものを解析に用いた。OATP1B1/MDR1 発現系については、MDCKII 細胞に MDR1 が安定発現している細胞 (Dr. Piet Borst (National Cancer Institute, The Netherlands)より提供)に、OATP1B1 cDNA を含む発現ベクターを導入し、薬剤耐性マーカーを用いてクローン選択を行ったものを用いた。OATP1B1/BCRP 発現系については、OATP1B1 安定発現 MDCKII 細胞に、BCRP 発現組み換えアデノウイルスを感染させることで、一過性の共発現系として解析に用いた。ヒト CMVs は、ヒト肝ブロック (HAB(human and animal bridging)研究機構より提供)より常法にて調製した。Western blot については、ヒト CMVs ならびに共発現系の crude membrane fraction を蛋白質量を固定して数点ふって行うことで、総蛋白質量と、トランスポーターの特

異的なバンド濃度が線形性を保っているような量において、相対的な発現量の比較を行った。

2) 副作用発現の原因となるトランスポーターに関する臨床研究

研究要旨記載の(1)の一部~(3)は、それぞれの基質薬物を健常成人に投与することで、体内動態等を評価した (臨床試験の実施)。また、(1)の一部、(4)は、鳥取大学医学部附属病院に通院し、基質薬物による治療を受ける患者を対象とした。(3)、(5)では、ヒト胎盤、肝臓を試料とした。それぞれの被検者あるいは試料より採取したゲノム DNA を使用し、遺伝子多型解析を実施した。

3) 難治性疾患に対する新治療法開発のための基礎的・臨床的検討

1. 臨床的検討

①対象患者

治験審査委員会で承認されたプロトコルをもとに、各症例に対して院内での症例適応会議が行われた。選択基準 (他の治療が無効な第IV期メラノーマ症例、種々の検査値が基準を満たしていることなど) の確認とともに、除外基準(performance status)が 3 以上、コントロール不能な感染症を有する症例、あるいは心、肺、肝、腎に重篤な基礎疾患を有する症例、治療前 4 週間以内に他の免疫治療や放射線照射を受けている症例) に該当していないことも確認された。

②DC 療法のプロトコル

患者からアフレーシスとフィコール法にて末梢血単核球を得、フラスコ付着細胞に GM-CSF と IL-4 を添加して 1 週間培養、未熟 DC を作製した。その後腫瘍溶解液を加えさらに TNF- α を添加して 4 日間培養し、成熟 DC とした細胞(1x10⁷ 個)を患者皮内に接種した。接種前後で、画像検査を行い腫瘍を計測評価した。また、自己単核球と腫瘍細胞に対する遅延型皮膚アレルギー反応検査(DTH)や治療前後での CTL アッセイ等も施行した。

2. 基礎的検討

①hPDMC から産生される hVEGF の生物活性について hPDMC の培養上清が hUVEC(human umbilical vein endothelial cell)の増殖を刺激するかを、ウエルごとのサイミジン(3H-thymidine)の取り込みをシンチレーターでカウントすることで検索する。ELISA で測定した hVEGF の値が生物学的活性と一致するかを検討する。

②NOD/Shi-scid における hPDMC の細胞移植に関する検討

異種間細胞移植(Xenograft)が可能な、重度免疫不全マウスの NOD/Shi-scid マウスを用いる。片側の大動脈を結紮して下肢虚血モデルを作製する。hPDMC を筋肉内に注射し、移植前、

移植 7 日後、移植 14 日後の血流をレーザー Doppler を用いて観察し、対照群と虚血の改善度を比較する。

③細胞移植された hPDMC から hVEGF の分泌動態

NOD/Shi-scid マウスに hPDMC を移植し、1 時間後、2 日後、7 日後にマウスを屠殺して注射部位の筋肉を取り出す。ヒト GAPDH mRNA の量が移植した hPDMC の生存を反映し、ヒト VEGF mRNA が VEGF の分泌期間を反映すると考え、それぞれの mRNA 量を定量する。

④ hPDMC から産生される hVEGF 以外の物質の検討

hPDMC が産生する hVEGF 以外の血管新生因子について検討するために、hPDMC の mRNA を抽出し、塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)、アンギオポイエチン 1, アンギオポイエチン 2、血小板由来成長因子(PDGF)の RT-PCR を行う。これで検出できる因子については、培養上清で ELISA を用いて蛋白濃度を測定する。

⑤hPDMC 細胞溶解液の創傷治癒への効果

hPDMC の細胞溶解液を親水軟膏に混合しマウスの創傷モデルに投与し、30 分間静置し、成長因子が傷害部に十分作用するようにする。創傷が治癒する約 10 日後に至るまで、72 時間毎にマウスを麻酔し、デジタルカメラで皮膚欠損部位を撮影する。コンピューターを用いて画像から皮膚欠損部の面積を計算し、対照と比較する。

4) 薬物トランスポーターの遺伝子発現の多様性に関する研究

13 名の患者末梢血中の RNA の発現量をマイクロアレイシステムを用いて定量し、発現量の個人差を測定した。また、単塩基多型情報を用いてアレル間の発現量の違いを検出することができ、多型部位を含む DNA 配列をシーケンサーを用いて配列決定すれば、それぞれのアレルからのシグナルが 1:1 で検出されるようなシステムを構築した。また、このシステムでは、cDNA 配列中に存在する多型を利用してそれぞれのアレルから読まれる RNA 量を比較することができる。また、SNP 検出用マイクロアレイをもちいてトランスポーター遺伝子アレル間の発現量比について検討した。2 枚の SNP 検出用マイクロアレイは各 SNP のアレルごとに相補的になるように設計されており、ハイブリダイゼーション後、シグナルに基づいて試料の SNP を判定し、また各アレルの発現量をシグナル強度又はシグナル比に基づいて比較することができる。

不死化リンパ球から抽出した DNA および RNA を用いて上記実験を行った。

さらに、単塩基多型 (SNP) に由来する質量の差を利用してアレルを識別することにより、アレル間の遺伝子発現の変化を定量的に検出する方法を開発した。DNA を鋳型としてプライマーエクステンションを行う際に SNP 部位を含めれば、産生される配列の質量を比較することによりゲノタイピングを行うことが可

能である。一方、cDNA を鋳型として同様の反応を行うことにより、RNA 量のアレル間の違いを検出することが可能である。

SNP 部位を含めてプライマーエクステンションし、ddNTP を取り込ませることにより伸長反応を停止させる。産物をマトリックス上にスポットした後に飛行時間型 MS (Sequenom) によりそれぞれのアレルからの産生物を定量した。

(倫理面への配慮)

1) については、in vitro 実験を行うためのヒトサンプルはいずれも連結不能匿名化された試料を用いており、採取時に書面による同意が得られているものを用いた。2) については、臨床試験は、臨床試験専門の施設で実施した。当該施設の倫理審査委員会、鳥取大学医学部倫理審査委員会の審査・承認の後に実施した。また、被検者に対しては、インフォームド・コンセントの徹底を図った。患者対象の検討やヒト臓器研究についても、上記と同様に、鳥取大学医学部倫理審査委員会の審査・承認の後に実施した。また、患者に対しては、インフォームド・コンセントの徹底を図った。3) については、院内の治験審査委員会の承認を受けたプロトコルに従っている。4) については、EBV により不死化したリンパ球株は徳島大学医学部公衆衛生学教室より分与を受けたもので連結不能匿名化されているものである。また平成 16 年度は臨床情報を有していない DNA および RNA 試料についてゲノタイピングを施行した。なお EBV により不死化したリンパ球株は ATCC より購入したものであり、連結不能匿名化されている。本研究は東京大学先端科学技術研究センター研究倫理審査委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

1) 副作用発現の原因となるトランスポーターの in vitro 実験系による同定および in vivo 臨床データ解析

CER と CsA の薬物間相互作用の解析では、CER のヒト肝細胞における取り込みに対する CsA の阻害を観察したところ、阻害定数 $K_i = 0.28-0.69 \mu\text{M}$ と高親和性の阻害が確認され、この K_i 値は OATP1B1 発現系における値とほぼ一致した。一方、ヒト肝ミクロソームでの代謝では、高濃度 ($>10 \mu\text{M}$) CsA 共存下でも CER の代謝の阻害能は極めて弱かった。これらから、CER と CsA の相互作用メカニズムは、OATP1B1 を介した CER の取り込み阻害であることを明らかとした。一方、CER と GEM の相互作用では、GEM の代謝物である M-3、GEM のグルクロン酸抱合体 (GEM-Glu) も併せて評価した。その結果、3 種の中で GEM-Glu が OATP1B1 を介した取り込みを最も強く阻害した。また、CER の代謝を担う CYP2C8 の能力を GEM-Glu は高親和性で阻害した。従って、CER と GEM の相互作用は、むしろ GEM-glu による CYP2C8 および一部 OATP1B1 の阻害によるものであることを明らかにした。

biguanide 系化合物 3 種はそれぞれ Oct1 発現細胞で有意な取り込みが見られた。また、Oct1 ノックアウトマウスと野生型マウスで投

与後の血中濃度推移、臓器分布を比較したところ、肝臓において Oct1(-/-)マウスでは、野生型の 1/30 倍の低い分布が見られた。一方、血中乳酸濃度の上昇は、metformin 投与量依存的であり、Oct1(-/-)マウスでは有意に低かった。ラット遊離肝細胞を用いて酸素消費の biguanide による阻害程度を観察したところ、この程度と、乳酸値の上昇との間に順位の相関が見られた。このことから、biguanide の毒性発現に、肝臓の Oct1 が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

statin の脳内移行メカニズムとして pravastatin, pitavastatin を用いた解析を行った。その結果、両化合物は、Oat3, Oatp2 の基質となることが明らかとなり、さらに、脳内からの排出を阻害剤共存下で見たところ、化合物間で阻害剤の感受性が異なることから、Oatp2, Oat3 がともに異なる寄与で両 statin の排出に関与することが明らかとなった。

OATP1B1*1a (野生型), OATP1B1*1b, OATP1B1*5 および OATP1B1*15 の多型変異体を安定発現させた HEK293 細胞を樹立した。その結果、各変異体とも膜上に発現が見られた。次に、E217BG の取り込みおよび速度論解析を試みたところ、親和性(Km 値)は変異体間で差異は見られないものの、Western blot 法を用いてバンド濃度で相対的な発現量を補正した Vmax 値が、OATP1B1*15 変異体においてのみ、野生型の約 10%と低値を示した。

また、一方 BCRP は、BCRP 多型変異体を LLC-PK1 細胞にアデノウイルスを用いて発現させたところ、全種類で発現が確認され、その局在は、S441N を除く変異体においては、生理的な局在と同じ apical 側であったのに対して、S441N 多型変異体については、細胞内コンパートメントへの局在が観察された。また、Western blot による発現量の比較では、ウイルスあたりの発現量では、S441N と Q141K 変異体で有意に低いという結果を示した。さらに、HEK293 細胞に BCRP 多型変異体を発現させ、そのベシクルを調製し、ATP-dependent な輸送を観察したところ、ES, DHEAS, MTX, PAH の輸送能力は、発現量で normalize した単位 BCRP あたりの輸送クリアランスで比較すると、(発現の極端に少ない S441N を除いて)Q141K も含めて同じ値を示した。また、V12M, Q141K とも ES の輸送の親和性は、野生型と比較して有意差は観察されなかった。

OATP1B1, OATP1B3 の寄与率評価法として 2 つの方法を用いた。1 つは、estrone-3-sulfate (E-sul) を OATP1B1 の、cholecystokinin octapeptide (CCK-8) を OATP1B3 のそれぞれ選択的基質として用い、テスト化合物について、OATP1B1, OATP1B3 の発現系における取り込みクリアランスを観察し、それらに、選択的基質の取り込みから算出した輸送活性の比をかけることで、肝細胞における OATP1B1, OATP1B3 を介した取り込みクリアランスを計算で見積もることができるという考え方である。もう 1 つは、Western blot を用いて直接肝細胞と発現系の発現量の比較を行って比を算出し、上記と同様の検討を行う方法である。実際にこの方法を用いて、E217BG および pitavastatin の肝細胞への取り込みにおける OATP1B1, OATP1B3 それぞ

れの寄与率の算定を行った結果、いずれの方法論でも、両化合物に関して OATP1B1 を介した取り込みが約 90%を占める事がわかった。

一方、排泄側は、モデル化合物 4 種の共発現系における経細胞輸送を観察したところ、EG は、OATP1B1/MRP2, OATP1B1/MDR1, OATP1B1/BCRP すべての発現系において basal から apical 方向への経細胞輸送が観察された。一方、ES も、3 種の共発現系において方向性のある輸送が観察されているが、OATP1B1 単独発現系でも反対方向の輸送と比較して有意な輸送が観察されており、それらを考慮すると、MRP2 を発現したことによる輸送の enhancement は小さく、あまり良好な基質でないことが示唆された。一方、HMG-CoA 還元酵素阻害薬同士の比較では、pravastatin は、OATP1B1/MRP2 における輸送は相対的に見て大きいという結果を得たが、cerivastatin においては、すべての発現系でほぼ同等の経細胞輸送が観察された。さらに、経細胞輸送を細胞内濃度で除した細胞から apical 側への排出クリアランスを算出したところ、EG, pravastatin は、ともに MRP2 による輸送が大きい一方で、ES では、BCRP が、cerivastatin では、MRP2 と MDR1 がほぼ同等の輸送能力を示した。さらに、ヒト CMV と共発現系の間での発現量の比較をしてその比 (CMV/発現系) を算出したところ、MDR1>MRP2>BCRP の順であった。

2) 副作用発現の原因となるトランスポーターに関する臨床研究

多くの知見が得られたが、主な結果を抜粋する。(1). OATP-C 遺伝子多型とプラバスタチン体内動態を評価した結果、V174A 変異保有者では、有意な AUC の上昇、腎外クリアランスの低下が観察された。

(2). V174A 保有者では、プラバスタチン肝取り込みの減少が予想された。臨床では、本変異を有することで、十分なコレステロール低下作用が得られないことが想定されることから、治療を受ける患者での検証を行った。その結果、本変異保有者は他の遺伝子型の患者より 2 ヶ月後の血中コレステロール値の低下率が最も低かった。

(3). OATP-C は肝ビリルビン輸送にも寄与し、V174A 保有者では、血中遊離型ビリルビン高値であった。

(4). 20 箇所の変異を BCRP 遺伝子に同定した。その中で、421C>A (G141L)変異にヒト胎盤・肝でのタンパク発現量を低下させる傾向を認めた。基質薬物を用いた臨床試験の結果、本変異に加え、376C>T 変異を有する被検者の 4-メチルウンベリフェロン硫酸抱合体濃度の有意な上昇を観察した。さらに、両臓器での BCRP 遺伝子の発現には、両対立遺伝子間で発現量の異なる現象が観察された。

(5). 2 型糖尿病治療薬メトホルミンに対してノンレスポーターとなる原因を肝取り込みトランスポーターである OCT1 の機能低下と考

え、OCT1 遺伝子多型解析とレスポンターの遺伝子型との比較を行った。その結果、V408M 変異の頻度がノンレスポンターで高い結果が得られた。さらに、肝における OCT1 mRNA 発現量を遺伝子型で評価した所、本変異を有する検体で発現量の低下を認めた。

(6) MDR1 遺伝子プロモーター領域の詳細な解析を行った結果、10 種類のハプロタイプを認めた。次に、ヒト肝・胎盤に発現する MDR1 mRNA 量との関連を評価した結果、ハプロタイプ 2, 3 で有意な発現量の増加が観察された。Luciferase assay、electrophoretic mobility shift assay、メチル化解析の結果、T-1517aC、T-1017aC、T-129C が転写に重要な部位であることが明らかとなった。さらに、これらのプロモーター変異は、2677 位や 3435 位の変異とは独立した変異であった。

3) 難治性疾患に対する新治療法開発のための基礎的・臨床的検討

1. 臨床的検討

①患者背景と投与結果

10 名のエントリー患者の年齢は 24~75 歳で、男性 5 名、女性 5 名であった。1 例を除いてはすでに手術切除・化学治療が先行しており、これ以上の治療法が望めない遠隔転移を伴う第 IV 期悪性黒色腫患者であった。表面マーカーをフローサイトメトリーで解析し、誘導した DC の確認を全症例で行なった (CD14 陰性、CD86、HLA-class I、HLA-class II 陽性など)。10 症例中 SD1 名、MR2 名、PD7 名の結果となった。免疫学的効果の評価について、DTH と治療反応性との相関は認めなかった。CTL 活性については、SD、MR の症例でその増加が認められたが、PD の症例でも同様の結果が得られ、解釈は困難であった。追加接種を行なった MR の 2 症例では経過中、複数ヶ所で炎症反応を伴った腫瘍壊死反応、その後の腫瘍の縮小や消失が認められた。抗核抗体、リウマチ因子などの自己抗体については治療後に陽性となった症例はいなかった。

②反応の認められた患者について

MR の 2 症例においては複数の転移巣の壊死とそれに続く腫瘍の縮小あるいは消失が認められた。病理学的な検索の結果、壊死は腫瘍血管内皮の破綻によると結論された。破綻した血管内皮の部分に細胞浸潤はなく、液性因子によると考えられた。MR の 2 症例について、治療前後の血清で腫瘍に反応する抗体が変化するか否かを検索中である。また抗核抗体やリウマチ因子以外の自己抗体の存在については特に認められなかった。

2. 基礎的検討

①hPDMC から産生される hVEGF の生物活性の検討

培地にリコンビナント hVEGF を添加すると用量依存性に hUVEC の 3H-サイミジン取り込みが増加した。ヒト胎盤細胞の培養上清を添加しても hUVEC の 3H-サイミジン取り込みは増加した。3H-サイミジンの取り込み値はリコンビナント hVEGF 添加とほぼ同等であり、ヒト胎盤細胞から産生される hVEGF は十分な生物活性を有すると結論された。

②NOD/Shi-scid における hPDMC の細胞移植に関する検討

片側の大腿動脈結紮後、患肢の血流を健側と比較したところ、hPDMC 投与群で前値 0.2108 ± 0.0077 (mean \pm SE) に対し、7 日後は 0.5110 ± 0.056 に改善した (n=17)。PBS のみを投与した群では前値 0.2277 ± 0.012 で、7 日後は 0.3461 ± 0.0275 であった (n=13)。ヒト末梢血単核球投与群では前値 0.2071 ± 0.0093 で 7 日後は 0.3996 ± 0.0446 であった (n=17)。hPDMC 投与群は対照群に比較して有意に血流を改善した (Mann-Whitney u-test, $p < 0.05$) が、ヒト末梢血単核球投与群は対照群に比較して有意差を認めなかった。このようにヒト胎盤細胞は in vivo において血管新生作用を示した。

③細胞移植された hPDMC から hVEGF の分泌動態

hPDMC 移植 1 時間後の筋肉内 hVEGF mRNA の発現の程度を 1.0 とした場合、2 日後は 0.11 ± 0.017 (n=3)、7 日後は 0.013 ± 0.00086 であった。非投与群では発現は認められなかった。この実験から移植された hPDMC は少なくとも 7 日感は投与部位で生存して hVEGF を産生していることが示唆された。

④hPDMC から産生される hVEGF 以外の物質の検討

RT-PCR の結果、bFGF とアンギオポイエチン 1 mRNA の発現があることが判明した。ELISA を用いて bFGF を測定したところ、細胞培養上清中には検出されなかったが、細胞溶解液に高濃度に存在することが明らかとなった。アンギオポイエチン 1 についてはよい ELISA が内ので今後の検討課題となった。

⑤hPDMC 細胞溶解液の創傷治癒への効果
皮膚切除 10 日後に計測した欠損皮膚は、対照群で $99.1 \pm 11.1 \text{mm}^2$ (mean \pm SE, n=20) に対し hPDMC 投与群では $70.5 \pm 6.4 \text{mm}^2$ であった。hPDMC 投与群は対照群に比較して有意に皮膚損傷を改善した (Mann-Whitney u-test, $p < 0.05$)。

4) 薬物トランスポーターの遺伝子発現の多様性に関する研究

不死化リンパ球 RNA の解析では発現量に大きなばらつきが認められる ABC トランスポーター遺伝子が認められた。同一家系からの検体を解析することにより、発現量多様性

が遺伝性のものであるのか否かについて今後明らかにされるものと期待される。また、本年はリンパ球あるいは末梢血を用いて解析を行ったが、腸管や肝臓などの薬物動態を制御する主要臓器や腫瘍細胞などでの発現にもジェノタイプによる発現量の違いがあるかどうかについて同様な検討を進める必要がある。

トランスポーター遺伝子が多数のエクソンから構成されることからスプライシング変異が多様な転写産物をもたらす。次年度以降にはゲノムタイリングアレイを用いて変異転写産物の多様性についての検討も行う予定である。

D. 考察

1) 副作用発現の原因となるトランスポーターの *in vitro* 実験系による同定および *in vivo* 臨床データ解析

cerivastatin(CER)と cyclosporin A(CsA)の薬物間相互作用メカニズムの解析において、CER のヒト凍結肝細胞における取り込みの CsA による阻害の程度(K_i 値)は、OATP1B1 発現細胞における値とほぼ同等で、CsA の肝臓での最大非結合型濃度も大体同じ値をとることから、実際の臨床においても、OATP1B1 を介した肝取り込み過程の相互作用がおきうることが示唆された。一方で、CER は代謝も受けることから、代謝過程における相互作用の可能性も考えられたが、代謝実験の結果から、臨床濃度範囲では代謝相互作用は考えにくいという結論に至った。さらに、CER と gemfibrozil との相互作用では、cerivastatin と gemfibrozil との相互作用について、トランスポーターと代謝の両面から検討を行った。その結果、gemfibrozil および gem-M3 のトランスポーター(OATP1B1)ならびに代謝酵素(CYP2C8, CYP3A4)の阻害能は小さく、かつ血中蛋白非結合型濃度からは相互作用を説明できないという結論となった。一方で、gem-glu がトランスポーター、代謝酵素、とりわけ CYP2C8 に対して強い阻害能を有することがわかった。一方で、cerivastatin の代謝に関わる主要な CYP は、2C8 であることが示された。また、gem-glu は、抱合体において予想されるように蛋白非結合型分率が高く、阻害に直接関与すると考えられる free 濃度は他の分子種に比較して高く、また、gem-glu は動物実験の結果から、肝臓内濃度は、血液中濃度と比較して、数十倍の濃縮がかかることが報告されており、これを考慮すると、濃縮率を考慮した動態モデルから、血中濃度が数倍に上昇することが説明可能である結果を得た。今回おこなったような解析より、トランスポーターと代謝酵素のそれぞれがどの程度相互作用に

関わるか定量的に評価する方法論を提示しており、今後、あらゆるケースにおいて適用可能な評価法であると考えている。OATP1B1 は、多くの薬物の取り込みに重要な役割を果たしていることが考えられており、このトランスポーターを介した相互作用が多くの薬物でおこりうることが示唆され、今後いろんな事例がでてくることが推察される。

また、biguanide 系化合物の副作用発現には、Oct1 の肝への発現が重要であることを示した。今後、Oct1 により取り込まれる能力が小さく、かつ、肝取り込み過程の K_m 値が、ミトコンドリアでの呼吸鎖阻害の IC_{50} 値より小さい値をとるような薬物を創生できれば、より安全な biguanide 系薬物が実現するかもしれない、現在更なる検討を進めている。

statins の脳内からの排出機構についての解析では、脳内からの statin の排出は、2 化合物とも、飽和性を示し、probenecid でほぼ完全に阻害されたことから、有機アニオン輸送系を介して能動的に排出されていることが示唆された。また、同一の statins でも、阻害剤の感受性が異なることから、排出機構の相対的な寄与が異なる可能性が示唆される。pravastatin に関しては、阻害剤のパターンから Oat3, Oatp2 による排出の寄与はほぼ同等であると考えられる一方で、pitavastatin では、おそらく Oatp2 が主要な寄与を占めている可能性が示唆された。このことは、Oat3, Oatp2 発現系を用いた輸送実験の結果から、Oatp2 による輸送クリアランスが、pitavastatin の方が、pravastatin の輸送よりも有意に大きかったことと矛盾しない。よって、同系統の薬物でも脳内濃度を定める排出輸送系が違うということが示唆されており、今後、他の薬物についても、寄与の違いが見られるか、またそれらによって、どのような臨床的な所見の違いが生まれるかについて、さらなる検討が求められると考えている。

OATP1B1 の遺伝子多型体の *in vitro* 機能比較より、OATP1B1*15 において、単位発現量あたりの V_{max} 値が野生型と比較して、大幅に小さいことが示唆される結果を得た。この結果は、共同研究者の家入らによる臨床研究でのプラバスタチンの肝クリアランスの低下の度合いと定量的に一致していることから、おそらく OATP1B1*15 保有者においては、発現量は、野生型の保有者と差がないが、単位蛋白あたりのクリアランスの低下が、肝クリアランスの低下につながっているであろう結果を得た。また、OATP1B1 の遺伝子多型体の *in vitro* 機能比較より、OATP1B1*15 において、単位発現量あたりの V_{max} 値が野生型と比較して、大幅に小さいことが示唆される結果を

得た。この結果は、昨年度共同研究者の家入らによる臨床研究でのプラバスタチンの肝クリアランスの低下の度合いと定量的に一致していることから、おそらく OATP1B1*15 保有者においては、発現量は、野生型の保有者と差がないが、単位蛋白あたりのクリアランスの低下が、肝クリアランスの低下につながっているであろう結果を得た。

BCRP の多型に関しては、S441N は、非常に頻度の低い多型であるが、細胞内局在が細胞内であり、また、発現量が非常に少ないことから、おそらく、小胞体において、一連の蛋白品質管理機構（シャペロンなど）に認識されてトラップされ、成熟できない可能性が示唆される。一方、他の多型変異体は、局在には影響を与えなかった。しかし、発現量で比較をすると、Q141K については、有意にウィルスタイターあたりの発現量は低下していることが明らかとなり、併せて、実際にヒト胎盤においても、Q141K 保持者において、有意に発現量が低下していることが示されており、我々の結果が、単なる *in vitro* 実験系による artifact ではないことを支持している。一方、機能を膜ベシクルを用いて調べたところ、今回用いた 4 種類の基質に関しては、いずれの変異体においても単位 BCRP あたりの輸送クリアランスは、いずれも同じであり、機能には変異が影響を与えないことが示唆される。従って、Q141K は、機能・局在には影響を与えないが、発現量が有意に低下しており、その結果、機能低下が認められる多型であると考えられた。BCRP は、肝臓・腎臓・小腸・脳・胎盤・乳腺に発現が認められ、薬物の吸収、代謝、分布に栄養を与える可能性がある。また、Q141K については、西洋人と比較して、日本人では頻度が高く、10 名に 1 人はホモでこの変異アレルを有していることから、この保有者では薬物動態が有意に変化する可能性が考えられ、今後臨床との対応を探っていくことが必要であると思われる。

肝取り込みトランスポーター OATP1B1, OATP1B3 に関して、寄与率評価法を確立した。2 種類の方法、すなわち、選択的基質の輸送をもとに輸送活性の比から発現量の差を補正する方法と、Western blot により直接的に発現量を比較する方法を用いて評価を行い、両者の結果が一致することから、これら評価法の妥当性が示されたと考えている。肝取り込み過程には、他にも OATP-B, OAT2 といった有機アニオンを認識するトランスポーター群が存在することから、より厳密な寄与率の評価が今後必要であると考え、詳細な検討を進めている。

さらに、排泄側については、かつては、主

に脂溶性が高く中性・塩基性の化合物を輸送する MDR1, アニオン性の化合物を広範に基質として認識する MRP2 のように薬物の性質によりある程度分類がされると考えられてきたが、近年、主に硫酸抱合体を良好な基質とする BCRP が、広範なアニオン性化合物を認識することがわかってきたこと、さらには、MDR1 にも、一部の有機アニオン（例えば、fexofenadine など）が、認識されることが報告されており、有機アニオンの輸送には、これらすべてのトランスポーターが協調的に胆汁排泄に関与していることが考えられた。一方、有機アニオンは、電荷的にも細胞内に入れることが難しく、ゆえに排泄側のトランスポーターの機能解析が困難であった。我々は、これまで、有機アニオンを広範な基質として認識する肝取り込みトランスポーター OATP1B1 と糞出トランスポーター MRP2 を極性細胞に発現させ、basal から apical 方向への輸送が観察されるような共発現系を構築してきた。その系を用いて寄与率の検討を試みた結果、各基質により排出トランスポーターの相対的な輸送活性は、異なることが示され、例えば、ほぼ同一骨格を有する HMG-CoA 還元酵素阻害薬、pravastatin と pitavastatin では、排出トランスポーターの寄与が異なることが示唆され、これらが、今後遺伝子多型や薬物間相互作用、病態等による発現変動時に薬物動態に与える影響が異なる可能性を示唆しており、臨床でのこれらの意味づけが重要になると考えられる。また、EG pravastatin は、これまでの当教室での検討において、Mrp2 を欠損したラットである EHBR において胆汁排泄が起こらなくなることから、Mrp2 が major なトランスポーターであることが示唆されており、この共発現系においても、EG pravastatin がともに MRP2 における排出クリアランスが大きかったことと合致しており、興味深い結果である。ただ、ヒト CMVs と共発現系との間の発現量の比較においては、MDR1 の単位蛋白量あたりの発現量が、相対的に見て、CMV で多く、MRP2 がほぼ同等、BCRP が CMV ではほとんど検出されないくらいであったことから、結果として、すべての基質について、計算上 MDR1 が major なトランスポーターであるという結果となった。ここについては、肝ブロックでの保存条件、CMV 調製中のトランスポーターの安定性の違いなどクリアすべき問題は多く、現時点で明確な結論は出せない。しかしながら、化合物間で相対的な寄与を見積もることは今回構築した共発現系よりできるため、今後さらに事例を増やし、より正確な寄与率の推定へ向けて方法論を考察していく予定である。

2) 副作用発現の原因となるトランスポーターに関する臨床研究

本検討では、取り込みに関するトランスポーターとして、OATP1B1, OCT1 を、排出に関するトランスポーターとして、BCRP, MDR1, MRP2 の機能評価を遺伝子解析を通して行った。薬物トランスポーターは、生体中での薬物の動態に大きく関与し、一部の評価を加えた薬物については、臨床効果に見る個人差の原因と考えられた。特に、高齢者社会を迎えるに当たり、処方拡大が予想される高脂血症治療薬や糖尿病治療薬での知見は、今後の薬物療法の個別適正化への有用な情報源となると思われる。本検討では、主に消化管と肝臓に発現するトランスポーターを対象として研究を進めたが、多くの、基質を共通するトランスポーターが同時に組織に発現していることから、今後は、単一から多遺伝子の関与を考慮した研究展開が必要と言える。

3) 難治性疾患に対する新治療法開発のための基礎的・臨床的検討

1. 臨床的検討

悪性黒色腫に対しては以前から様々な免疫治療が試みられていたが、奏効率は低かった。近年の腫瘍特異抗原・ペプチドの同定や DC による強力な免疫誘導などの解析から、これらを利用した腫瘍免疫療法プロトコルが試みられてきている。しかし、効果についてもさらなる検討が必要であると思われ、未だ確立した治療とはいえないのが現状であろう。我々のプロトコルでは DC に患者腫瘍溶解液を組み合わせているが、ペプチドを用いたプロトコルでは腫瘍特異性が高い、誘導されたペプチド特異的 CD8+細胞がテトラマー解析により確認できるなどの利点があるが、HLA 型に拘束されるため適応に限られる他、腫瘍の抗原消失などの問題もある。腫瘍全体を用いる場合には、腫瘍特異性は落ちるが未知の抗原・複数の抗原を含む、どの HLA 型に患者へも応用できるなどの利点がある。これまで報告された腫瘍免疫治療臨床研究において我々が今回繰返し経験したような腫瘍壊死反応についての記載はない。液性因子による腫瘍血管内皮の破綻が原因と考えられるが、現在その詳細な機序は不明である。副作用については DC 接種部の軽度の発赤以外に明らかなものは認められなかった。また抗核抗体、リウマチ因子等についても治療後に変化することはなかった。よって安全に行える治療であると結論された。

2. 基礎的検討

生活様式の欧米化に伴い、日本では糖尿病をはじめとする生活習慣病に伴う心筋梗塞や下肢閉塞性動脈硬化症などの虚血性疾患の頻度が増加している。これらの疾患は生命を脅か

したり、生活の質を著しく低下させるため、医療上重要な問題であり、また治療の社会的ニーズも高い。虚血性疾患に対する血管新生促進療法としては、国内外のいくつかのグループが、数種類の異なった試みを行っている。それらは以下の通りに大別される。

① 血管新生促進因子を虚血部分に局所注入する方法。

② 血管新生促進因子遺伝子を組み込んだプラスミドあるいはアデノウイルスベクターを患部に局所投与する方法。

③ 自己骨髄単核球、あるいは自己末梢血単核球を虚血部に注射する細胞療法。

①では局所投与された血管新生因子は速やかに吸収されて体循環に拡散してしまうため、因子を局所に止めて血管新生を促進することは困難である。②のプラスミドでは遺伝子発現効率の低さが問題となり、アデノウイルスでは発現効率は高いものの、アデノウイルスベクターをヒトに投与することの安全性が問題視されている。③の細胞療法では、自己の末梢血単核球や骨髄単核球を採取するために全身麻酔やアフレーシスが必要となるなど患者への侵襲（負担）が問題となる。特に難治性の虚血性疾患は高齢者に多いのでこの問題は重要である。

以上の通り、患者への侵襲が少なく、安全かつ有効な新しい治療法の開発が望まれている。血管新生因子を産生する同種細胞の移植治療が可能になればこの問題は解決されるが、これまで安全で適切な細胞がなかった。私たちの見いだした胎盤細胞の移植はこの目的にかなっていると考えられる。局所での mRNA の発現は少なくとも投与後 7 日間認められた。さらに hPDMC に関する研究を続けたが、その理由は細胞移植は手間のかかる治療であり、可能であればより簡便な治療を開発する必要があったからである。hPDMC からは hVEGF 以外の血管新生因子や成長因子が産生されている可能性があったため、これらを検討したところ、bFGF やアングリオポイエチン 1 も産生していることが明らかとなった。これらの事実から、hPDMC の溶解液を含む軟膏が開発できるのではないかと考え、親水軟膏に溶解液を混合してマウス皮膚損傷モデルに投与したところ、治癒の促進が認められた。今回はマウスの皮膚切除モデルを用いたが、マウスの火傷モデル、褥瘡モデルでも効果があるかを検討する予定である。

4) 薬物トランスポーターの遺伝子発現の多様性に関する研究

ABCB1 や ABCC2 のように既に DNA 多型との関連が報告されている遺伝子については、来年度以降タイピング情報との関連を検討する必要がある。研究班内の共同研究としてト

ランスポーター遺伝子のゲノム領域、とりわけプロモーター領域に存在する DNA 多型についてタイピングを行い、発現レベルとの相関、さらには薬物刺激による発現変動がどうかについて検討を進める予定である。本年はリンパ球あるいは末梢血を用いて解析を行ったが、腸管や肝臓などの薬物動態を制御する主要臓器や腫瘍細胞などでの発現にもジェノタイプによる発現量の違いがあるかどうかについて検討を進める必要がある。ランスポーター遺伝子が多数のエクソンから構成されることからスプライシング変異が多様な転写産物をもたらす。不死化リンパ球 RNA の解析では発現量に大きなばらつきが認められる ABC トランスポーター遺伝子が認められた。同一家系からの検体を解析することにより、発現量多様性が遺伝性のものであるのか否かについて今後明らかにされるものと期待される。また、本年はリンパ球あるいは末梢血を用いて解析を行ったが、腸管や肝臓などの薬物動態を制御する主要臓器や腫瘍細胞などでの発現にもジェノタイプによる発現量の違いがあるかどうかについて同様な検討を進める必要がある。

ランスポーター遺伝子が多数のエクソンから構成されることからスプライシング変異が多様な転写産物をもたらす。次年度以降にはゲノムタイピングアレイを用いて変異転写産物の多様性についての検討も行う予定である。

E. 結論

CER と CsA の相互作用は、肝取り込みトランスポーター OATP1B1 を介した肝取り込み過程の阻害によるものであり、一方、CER と GEM との相互作用は、代謝物である GEM-Glu が、OATP1B1、CYP2C9 の両方を阻害するためであると考えられる。

biguanide 系化合物の乳酸アシドーシスの発現には、Oct1 による肝取り込み能力が寄与することがあきらかとなり、また、肝における暴露量と、血中乳酸値上昇、また、ミトコンドリア呼吸鎖阻害活性がすべて相関することが明らかとなった。

statins の脳からの排出の解析から、pravastatin, pitavastatin は、能動的に排出を受けており、さらに、両薬物の排出に関与するトランスポーターの相対的な寄与が異なることが示された。

OATP1B1 の遺伝子多型体の *in vitro* 機能比較の結果、OATP1B1*15 に関して、単位蛋白量あたりの V_{max} 値が大幅に減少する事を見出し、これが臨床研究における肝クリアランスの減少を定量的に反映していることがわか

った。また、BCRP 変異体発現系による *in vitro* 解析の結果、日本人で高頻度に認められる Q141K 変異については、単位 BCRP あたりの輸送活性には変化はないが、発現量として低下することで、活性の低下が野生型と比較して起きている可能性が示唆された。

肝取り込みにおける OATP1B1、OATP1B3 の寄与を分離評価する方法を見出し、モデル化合物 2 種 (E217βG, pitavastatin) について OATP1B1 が主にその肝取り込みに関わる事を明らかにした。また、2 種の方法を用いて検討した結果、両方の方法で共に一致する結果を得た。また、OATP1B1/MDR1、OATP1B1/BCRP、OATP1B1/MRP2 共発現系を用いて、有機アニオン化合物の経細胞輸送を観察し、各化合物により、排出トランスポーターの寄与が異なることを示し、これら共発現系が相対的な排出トランスポーターの寄与を決める実験系として有用であることを示した。

また、数多くの事例で、トランスポーターの遺伝子多型と薬物の動態、効果・副作用が相関する事例を見出し、薬物トランスポーターは、生体中での薬物の動態に大きく関与し、一部の薬物については、臨床効果や体内動態に見る個人差の原因と考えられた。

臨床的検討として第 IV 期悪性黒色腫患者 10 例に対して樹状細胞療法を行った。明らかな副作用は認められなかった。10 例中 3 例において腫瘍に対する反応が認められ、うち 2 例で複数の転移巣の壊死が認められた。DTH 反応や CTL 活性と腫瘍反応とは相関が無く、液性免疫による腫瘍血管内皮の破綻が原因であると結論された。

基礎的検討として hPDM を用いた新しい治療法の可能性を検討した。hPDMC は生物学的に活性のある hVEGF を産生し、虚血動物モデルへ細胞移植すると有意に血流を改善した。移植された細胞は少なくとも 7 日間は hVEGF を産生し続けた。また hPDMC は hVEGF 以外にも bFGF やアングリオポイエチン 1 を産生し、hPDMC の溶解液を含む軟膏は、マウス皮膚損傷モデルの治癒を促進させた。

ABCA1 や ABCB1 遺伝子は発現値にばらつきが高く、発現量に個人差のある可能性が示唆された。SNP を利用してトランスポーター遺伝子の発現量多様性を検出できた。質量分析法を用いることによりアレル間の遺伝子発現量の変動を検出することに成功した。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Shitara, Y., Itoh, T., Sato, H., Li, A.P. and Sugiyama Y. Inhibition of Transporter-Mediated Hepatic Uptake as a Mechanism for Drug-Drug Interaction between Cerivastatin and Cyclosporin A. *J Pharmacol Exp Ther*, 304(2), 610-616, 2003
- Wang, D-S., Jonker, J.W., Kato, Y., Kusuhara, H., Schinkel, A.H. and Sugiyama, Y. Involvement of organic cation transporter 1 in the hepatic and intestinal distribution of metformin. *J Pharmacol Exp Ther*, 302, 510-515, 2002
- Wang, D-S., Kusuhara, H., Kato, Y., Jonker, J.W., Schinkel, A.H. and Sugiyama, Y. Involvement of organic cation transporter 1 in the Lactic Acidosis Caused by Metformin. *Mol Pharmacol*, 63, 844-848, 2003
- 設楽悦久、杉山雄一 トランスポーターを介した肝への取り込み過程で生じる薬物間相互作用 薬理と治療, 30 suppl, S425-431, 2002
- 楠原洋之、王徳勝、加藤将夫、杉山雄一 ビグアナイド系化合物により誘起される乳酸アシドーシスへの有機カチオントランスポーター(Oct1)の関与 薬理と治療, 30 suppl, S437-439, 2002
- 松島総一郎、前田和哉、佐々木誠、鈴木洋史、杉山雄一、設楽悦久 ヒト OATP2 と MRP2 を同時発現させたダブルトランスフェクタントの評価 一肝臓における cerivastatin の経細胞輸送特性の定量的評価に向けて一 薬理と治療, 30 suppl, S441-444, 2002
- Kato, Y., Suzuki, H. and Sugiyama, Y. Toxicological implications of hepatobiliary transporters. *Toxicology*, 181-182, 287-290, 2002
- Mizuno, N. and Sugiyama, Y. Drug Transporters: Their role and importance in the selection and development of new drugs. *Drug Metabol Pharmacokin*, 17, 93-108, 2002
- Nishizato Y, Ieiri I, Suzuki H, et al. Polymorphisms of OATP-C (SLC21A6) and OAT3 (SLC22A8) genes: Consequences for pravastatin pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther*, in press (2003).
- 家入一郎. トランスポーターの臨床的意義-遺伝子多型から見る薬物療法への寄与-, ファルマシア、印刷中、2003.
- Zhang X., Nakaoka T., Nishishita T., Watanabe N., Igura K., Shinomiya K., Takahashi T.A., and Yamashita N. Efficient Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Expression in Human Placenta-Derived Mesenchymal Cells. *Microbiol. Immuno.* in press (2003)
- Sato, K., Yamashita, N. and Matsuyama, T. Human peripheral blood monocyte-derived interleukin-10-induced semi-mature dendritic cells induce anergic CD4+ and CD8+T cells via presentation of the internalized soluble antigen and cross-presentation of the phagocytosed necrotic cellular fragments. *Cell. Immunol.*, 215, 186-194, (2002).
- Sato, K., Kawasaki, H., Morimoto, C., Yamashita, N. and Matsuyama, T. An Abortive Ligand-Induced Activation of CC Chemokine Receptor (CCR)1-Mediated Downstream Signaling Event and A Deficiency of CCR5 Expression are Associated with the Hyporesponsiveness of Human Naive CD4+T cells to CCL3 and CCL5. *J. Immunol* 15,168:6263-6272, (2002)
- Nagayama, H., Ooi, J., Tomonari, A., Iseki, T., Tojo, A., Tani, K., Takahashi, T. A. Yamashita, N., and Asano, S. Severe Immune Dysfunction after Lethal Neutron Irradiation in a JCO Nuclear Facility Accident Victim. *Inter. J. Hematol.* 76 157-164 (2002)
- Nagayama, H., Misawa, K., Tanaka, H., Ooi, J., Iseki, T., Tojo, A., Tani, K., Yamada, Y., Kodo, H., Takahashi, T.A., Yamashita, N., Shimazaki, S. and Asano, S. Transient hematopoietic stem cell rescue using umbilical cord blood for a lethally irradiated nuclear accident victim Bone Marrow Transplant. 29(3):197-204, (2002)
- Shitara Y, Li AP, Kato Y, Lu C, Ito K, Itoh T, Sugiyama Y. Function of uptake transporters for taurocholate and estradiol-17 β -D-glucuronide in cryopreserved human hepatocytes. *Drug Metab Pharmacokin*, 18, 33-41, 2003
- Suzuki M, Suzuki H, Sugimoto Y, Sugiyama Y. ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics. *J Biol Chem*, 278, 22644-22649, 2003
- Itoda M, Saito Y, Shirao K, Minami H, Ohtsu A, Yoshida T, Saijo N, Suzuki H, Sugiyama Y, Ozawa S, Sawada J. Eight novel single nucleotide polymorphisms in ABCG2/BCRP in Japanese cancer patients administered irinotecan. *Drug Metab Pharmacokin*, 18, 212-217, 2003
- Sugiyama D, Kusuhara H, Taniguchi H, Ishikawa S, Nozaki Y, Aburatani H, Sugiyama Y. Functional characterization of rat brain specific organic anion transporter (Oatp14) at the blood-brain barrier: High affinity transporter for thyroxine. *J Biol Chem*, 278, 43489-43495, 2003
- Mizuno N, Niwa T, Yotsumoto Y, Sugiyama Y. Impact of drug transporter studies on drug discovery and development. *Pharmacol Rev*, 55, 425-461, 2003
- 倉智嘉久、杉山雄一 上皮組織ベクトル輸送の分子基盤と機能制御 序論 「蛋白質・核酸・酵素」,

- 48(2), 101-104, 2003
- 伊藤晃成、鈴木洋史、堀江利治、杉山雄一 上皮組織ベクトル輸送の分子基盤と機能制御 薬物トランスポーターの局在とベクトル輸送 「蛋白質・核酸・酵素」, 48(2), 122-132, 2003
- 吉末訓弘、楠原洋之、杉山雄一 トランスポーター研究に基づく医薬品開発 「バイオサイエンスとインダストリー」, 61(7), 455-460, 2003
- 楠原洋之、杉山雄一 Pharmacogenomics 「現代医療」, 35(7), 1532-1540, 2003
- 前田和哉、神原美由紀、平野雅、杉山雄一 ヒト肝臓に高発現する OATP2, OATP8 の機能特性の解析と肝取り込み過程における寄与率の評価 "Progress in Drug Delivery System", 12, 33-42, 2003
- 平野雅、前田和哉、設楽悦久、杉山雄一 新規 HMG-CoA 還元酵素阻害薬ピタバスタチンのヒト肝選択的な分布メカニズムの解析 —OATP ファミリーの関与— 「薬理と治療」, 31 suppl., S-81-S-84, 2003
- 岩井めぐみ、鈴木洋史、西里洋平、家入一郎、大坪健司、杉山雄一 ヒト Organic Anion Transporting Polypeptide 2 (OATP2) 遺伝的多型変異体の *in vitro* 輸送機能の解析 「薬理と治療」, 31 suppl., S-101-S-104, 2003
- 岩井めぐみ、前田和哉、杉山雄一 遺伝子多型と抗がん剤の薬物動態(特集:癌ゲノム薬理学) 「血液・免疫・腫瘍」, 8(4), 26-32, 2003
- Takane H, Ieiri I and Otsubo K. Genetic polymorphism of organic anion and cation transporters: pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences in pharmacotherapy. *Curr Pharmacogenomics*, 1, 245-57, 2004
- Ieiri I, Takane H and Otsubo K. The MDR1 (ABCB1) gene polymorphism and its clinical implications. *Clin Pharmacokinet*, in press, 2004
- Zhang X, Nakaoka T, Nishishita T, Watanabe N, Igura K, Shinomiya K, Takahashi TA, Yamashita N. Efficient adeno- associated virus mediated gene expression in human placenta-derived mesenchymal cells. *Microbiology and Immunology*, 47, 109-116, 2003
- Sato K, Yamashita N, Baba M, Matsuyama T. Modified myeloid dendritic cells act as regulatory dendritic cells to induce anergic and regulatory T cell. *Blood*, 101, 3581-3589, 2003
- Sato K, Yamashita N, Yamashita N, Baba M, Matsuyama T. Regulatory dendritic cells protect mice from murine acute graft-versus-host disease and leukemia relaps. *Immunity*, 18, 367-379, 2003
- Watanabe T, Akishita M, Nakaoka T, Kozaki K, Miyahara Y, He H, Ohike Y, Ogita T, Inoue S, Muramatsu M, Yamashita N, Ouchi Y. Estrogen receptor beta mediates the inhibitory effect of estradiol on vascular smooth muscle cell proliferation. *Cardiovascular Research*, 59, 734-744, 2003
- Nagayama H, Sato K, Morishita M, Uchimaru K, Oyaizu N, Inazawa T, Yamasaki T, Enomoto M, Nakaoka T, Nakamura T, Maekawa T, Yamamoto A, Shimada S, Saida T, Kawakami Y, Asano S, Tani K, Takahashi TA, Yamashita N. Results of phase I clinical study using autologous tumor-lysate pulsed monocyte-derived mature dendritic cell vaccinations for stage IV malignant melanoma patients combined with low dose interleukin-2. *Melanoma Research*, 13, 1-10, 2003
- Watanabe T, Akishita M, He H, Miyahara Y, Nagano K, Nakaoka T, Yamashita N, Kozaki K, Ouchi Y. 17beta-Estradiol inhibits cardiac fibroblast growth through both subtypes of estrogen receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 311, 454-9, 2003
- Morishita M, Uchimaru K, Sato K, Yamashita S, Kanematsu T, Yamashita N. Thyroglobulin-pulsed human monocyte-derived dendritic cells induce CD4⁺T cell activation. *International Journal of Molecular Medicine*, 13, 33-39, 2004
- T Nishishita, K Ouchi, Z Xiaohong, T Inazawa, K Yoshiura, T Nakaoka, N Watanabe, K Igura, T A. Takahashi and N Yamashita. A potential pro-angiogenic cell therapy for ischemic disease with human placenta-derived mesenchymal cells., in press, 2004
- Ge X, Tsustumi S, Aburatani H, Iwata S. Reducing false positives in molecular pattern recognition. *Genome Informatics* 14:34-43, 2003
- Satoh T, Baba M, Nakatsuka D, Ishikawa Y, Aburatani H, Furuta K, Ishikawa T, Hatanaka H, Suzuki M, Watanabe Y. Role of heme oxygenase-1 protein in the neuroprotective effects of cyclopentenone prostaglandin derivatives under oxidative stress. *Eur J Neurosci*. 17(11): 2249-2255. 2003
- Shimizu H, Taniguchi H, Hippo Y, Hayashizaki Y, Aburatani H, Ishikawa T. Characterization of the mouse Abcc12 gene and its transcript encoding an ATP-binding cassette transporter, an orthologue of human ABCC12. *Gene*. 310:17-28. 2003
- Fujiwara Y, Yokoyama M, Sawada R, Seyama Y, Ishii M, Tsutsumi S, Aburatani H, Hanaka S, Itakura H, Matsumoto A. Analysis of comprehensive effects of polyunsaturated fatty acid on mRNA expression using a GeneChip. *J Nutr Sci Vitaminol*, 49: 125-132 2003
- Kano M, Nishimura K, Ishikawa S, Tsutsumi S, Hirota K, Hirose M, Aburatani H. Expression Imbalance Map: A New Visualization Method for Detection of mRNA Expression Imbalance